

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE



Applicant(s): NAKAMURA, Yusuke et al.

Group:

Application No.:

Examiner:

Filed: February 1, 2002

For: A METHOD FOR SNP (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM) TYPING

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents  
Box Patent Application  
Washington, D.C. 20231

February 1, 2002  
1254-0195P

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the applicant hereby claims the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	25700/2001	02/01/01

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By: 

ANDREW D. MEIKLE

Reg. No. 32,868

P. O. Box 747

Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment  
(703) 205-8000  
/rem

NAKAMURA, Yusuke et al.

BOOK

703-205-8000

Feb 1, 2003

1254-0195P

1 of 1

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2001年 2月 1日

出願番号  
Application Number:

特願2001-025700

出願人  
Applicant(s):

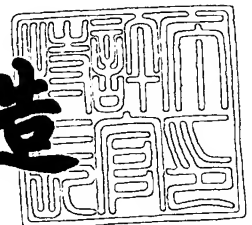
理化学研究所

JC868 U.S. PRO  
10/060301  
02/01/02

2001年11月16日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3100348

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH12-116S

【提出日】 平成13年 2月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/00

【発明の名称】 一塩基多型タイピング方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所内  
理化学研究所 遺伝子多型研究センター内

【氏名】 中村 祐輔

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所内  
理化学研究所 遺伝子多型研究センター内

【氏名】 田中 敏博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所内  
理化学研究所 遺伝子多型研究センター内

【氏名】 大西 洋三

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所内  
理化学研究所 遺伝子多型研究センター内

【氏名】 尾崎 浩一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所内  
理化学研究所 遺伝子多型研究センター内

【氏名】 山田 亮

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 一塩基多型タイピング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも一つ以上の一塩基多型部位を含む複数の塩基配列を、ゲノムDNA及び複数対のプライマーを用いて同時に増幅する増幅工程と、

上記増幅工程で増幅した複数の塩基配列を用いて、当該塩基配列に含まれる一塩基多型部位の塩基を判別するタイピング工程とを含む一塩基多型タイピング方法。

【請求項2】 上記増幅工程では、ホットスタート法を用いたポリメラーゼ連鎖反応を利用することを特徴とする請求項1記載の一塩基多型タイピング方法。

【請求項3】 上記増幅工程では、50対以上のプライマーを使用することを特徴とする請求項1記載の一塩基多型タイピング方法。

【請求項4】 上記タイピング工程では、インバーダー法又はタックマンPCR法を用いることを特徴とする請求項1記載の一塩基多型タイピング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ゲノムDNAにおける一塩基多型（いわゆる、「SNP」）部位の多型を判定する際に使用される一塩基多型タイピング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ヒトの姿形が千差万別であるように、30億からなる遺伝暗号も個人間で比較するとかなり多くの部位で異なっている。この遺伝暗号の違いを遺伝子多型（ポリモルフィズム）と呼んでおり、代表的な遺伝子多型として一塩基多型が知られている。

【0003】

一塩基多型（SNP: single nucleotide polymorphism）とは、複数の個体間における1塩基の違いを意味する。SNPは、その存在する位置によってcSNP(coding S

NP)とgSNP(genome SNP)に分類され、cSNPには、さらにsSNP(silent SNP)、rSNP(regulatory SNP)及びiSNP(intron SNP)が含まれる。本明細書においては、一塩基多型(以下、「SNP」という)が生じている部位、すなわち、ゲノムDNAにおいて、SNPが生じている所定の塩基を「一塩基多型部位」又は「SNP部位」と称する。

#### 【0004】

SNP部位は、ヒトゲノム中に300万～1000万箇所あると考えられている。これらのSNPには、タンパク質の発現調節又は機能等に影響を与えるものがあり、体質や疾病に対する易罹患性等の個人差に関与しているものがあると考えられている。したがって、SNPに関する情報を得ることによって、個人の体質に応じた医療(オーダーメイド医療)を行うことができる。このため、SNPの発見及び同定が盛んに行われており、すでに多数のSNPが報告されている。

#### 【0005】

今後は、各SNPが疾病、薬物に対する応答性又は体質等に対してどのような影響を与えるのかといった知見を解析することとなる。このためには、まず、各個人のSNPがどのようなものであるか、すなわち、SNP部位の塩基を判別する作業(SNPタイピング)を行わなければならない。このSNPタイピングは、一人あたり数十万箇所のSNP部位について行われるといった、大規模な解析作業となる。

#### 【0006】

具体的に、SNPタイピングとしては、ゲノムDNAを用いたタックマンPCR法、インベーター法、SniPer法、MALDI-TOF-MASS法、RCA法及びDNAチップ法等を挙げることができる。これらいずれの方法においても、1箇所のSNP部位についてタイピングを行うために、少なくとも数十ngのゲノムDNAを必要とする。すなわち、数十万箇所のSNP部位についてタイピングを行う場合、一人あたり数mgのゲノムDNAを必要とする。

#### 【0007】

しかしながら、数mgのゲノムDNAを得るためには、一人から1リットル近くの血液を採取しなければならず、事実上、一人から数mgのゲノムDNAを得ることは不可能である。このため、一人について数十万箇所に及ぶSNP部位のタイピングを

一度に行うことはできないのが現状である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明は、このような実状に鑑みて案出されたものであり、比較的少量のゲノムDNAを用いて数十万箇所にあつたSNP部位についてタイピングを行うことのできる一塩基多型タイピング方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

上述した目的を達成した本発明に係る一塩基多型タイピング方法は、少なくとも一つ以上の一塩基多型部位を含む複数の塩基配列を、ゲノムDNA及び複数対のプライマーを用いて同時に増幅する増幅工程と、上記増幅工程で増幅した複数の塩基配列を用いて、当該塩基配列に含まれる一塩基多型部位の塩基を判別するタイピング工程とを含むものである。

【0010】

また、本発明に係る一塩基多型タイピング方法においては、上記増幅工程でホットスタート法を用いたポリメラーゼ連鎖反応を利用することが好ましい。

さらに、本発明に係る一塩基多型タイピング方法においては、上記増幅工程で50対以上のプライマーを使用することが好ましい。

さらにまた、本発明に係る一塩基多型タイピング方法においては、上記タイピング工程でインバーダー法又はタックマンPCR法を用いることが好ましい。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明に係る一塩基多型タイピング方法について詳細に説明する。

本発明に係る一塩基多型タイピング方法では、先ず、解析対象のゲノムDNA及び複数対のプライマーを用いて、少なくとも一つ以上の一塩基多型部位を含む塩基配列を複数同時に増幅する増幅工程を行う。その後、増幅工程で増幅した塩基配列を用いてタイピングを行うタイピング工程を行う。

【0012】

1. 増幅工程

本方法において、解析対象のゲノムDNAは、従来より公知の手法を用いて抽出することができる。また、解析対象のゲノムDNAは、例えば、ヒトから採取した末梢血液より白血球を単離し、単離した白血球から定法に従って抽出することができる。特に、本方法では、数十万箇所のSNPをタイピングする場合、約数十 $\mu$ gのゲノムDNAを準備すればよい。言い換えると、本法によれば、数mlの末梢血液から数十万箇所のSNPをタイピングすることができる。

## 【0013】

増幅工程では、鋳型DNAとして準備したゲノムDNAと、タイピング対象のSNP部位を含む塩基配列を増幅する複数対のプライマーとを用いて、いわゆる、マルチプレックスポリメラーゼ連鎖反応（マルチプレックスPCR）を行う。ここで、複数対のプライマーは、SNP部位を挟む100～300bpDNA断片を増幅できるように設計されることが好ましい。これらプライマーは、17～25塩基であり、18～22塩基であることがより好ましい。これらプライマーは、タイピング対象のSNP部位を挟み込むように、例えば、GenBank等のデータベースに蓄積された塩基配列情報に基づいて設計される。

## 【0014】

増幅工程は、初めに鋳型DNA（ゲノムDNA）を熱変性させ、その後、鋳型DNAを変性させる熱変性工程、複数のプライマーを正確にアニーリングさせるアニーリング工程及びアニーリングしたプライマーからDNA鎖を合成する伸長工程からなるサイクルを繰り返し、最後に、さらにDNA鎖を伸長させる伸長工程を行う。なお、各工程における設定温度及び設定時間については、適宜設定することが好ましい。

## 【0015】

このような増幅工程においては、例えば100対のプライマーを用いて100領域の塩基配列を増幅する場合、鋳型DNA量を10～40ngとすることが好ましい。鋳型DNA量が10ng未満である場合には、100領域全てを増幅することが困難となる。言い換えると、増幅工程において鋳型DNA量が10ng以上であれば、後述するタイピング工程で確実にタイピングできる程度のDNA断片を増幅することができる。また、鋳型DNA量が40ngを越える場合には、数十万箇所のSNPについてタイピングを行



うとすると、多量のゲノムDNAを必要としてしまうため現実的ではない。

【0016】

このような増幅工程において、いわゆるホットスタート法を適用することが好ましい。ホットスタート法とは、プライマーのミスアニーリングやオリゴマー化を防止すべく反応溶液が高温になってから、DNAポリメラーゼによる伸長反応を開始させる手法である。具体的に、ホットスタート法としては、PCRに必須な組成のうち少なくとも一種を、反応溶液が高温になった時に初めて添加する方法、ワックスバリアーを使用する方法、DNAポリメラーゼに対するモノクローナル抗体を利用する方法が挙げられる。

【0017】

ワックスバリアーを使用する方法では、先ず、反応容器内に固形のワックスを介して、DNAポリメラーゼ及び鋳型DNAを含む上層溶液と、プライマー及びdNTPを含む下層溶液とを分離させておく。その後、所定の温度にまで加熱することによって、ワックスが溶融して上層溶液及び下層溶液が混合し、初めてPCRを進行させる。

【0018】

DNAポリメラーゼに対するモノクローナル抗体を利用する方法では、反応溶液が所定の温度になるまで、DNAポリメラーゼとモノクローナル抗体とを結合させ、DNAポリメラーゼを不活性化する。その後、反応溶液が所定の温度（約70度以上）にまで加熱されると、モノクローナル抗体が不可逆的に熱変性してDNAポリメラーゼから遊離する。これにより、DNAポリメラーゼは活性化し、PCRが進行することとなる。

【0019】

このように、いずれの方法であってもホットスタート法を用いることによって、各プライマーがミスアニーリングを起こした状態で伸長反応が進行してしまうことや、プライマー同士のオリゴマー化の発生を防止することができ、望ましくないDNA断片を増幅してしまうことを防止することができる。

【0020】

増幅工程において、上述したようなホットスタート法を適用した場合には、30

0対以上のプライマーを用いて、300領域以上の塩基配列を同時に増幅することができる。したがって、本方法において、上述したようなホットスタート法を適用することによって、より多くの塩基配列を同時に増幅できるため、より多くのSNPについてタイピングを行うことができる。

### 【0021】

#### 2. タイピング工程

タイピング工程は、上述した増幅工程で増幅したDNA断片を用いて複数のSNPについてタイピングを行う工程である。本方法では、増幅工程で得られたDNA断片を用いて、例えば、タックマンPCR法又はインバーダー法を適用してタイピングを行うことができる。

### 【0022】

タックマンPCR法とは、蛍光標識したアレル特異的オリゴヌクレオチド（以下、アレル特異的オリゴと称する）とタイピング対象のSNPを含む鋳型DNAとTaq DNAポリメラーゼとによるPCRを利用した方法である（Livak, K.J. Genet. Anal. 14, 143 (1999); Morris T. et al., J. Clin. Microbiol. 34, 2933 (1996)）。アレル特異的オリゴ（タックマンプローブともいう）は、SNP情報に基づいて設計することができ、5'末端にFAMやVICなどの蛍光レポーター色素Rによって標識されており、同時に3'末端がクエンチャーQ（消光物質）によって標識されている（図1）。従って、この状態ではクエンチャーが蛍光エネルギーを吸収するため、タックマンプローブからの蛍光は検出できない。また、タックマンプローブの3'末端はリン酸化されているため、PCR反応中にタックマンプローブからの伸長反応は起こらない（図1）。

### 【0023】

このタックマンプローブと、SNPを含む領域を増幅するように設計したプライマーとTaq DNAポリメラーゼとを用いて、鋳型DNAについてPCRを行うと、次の反応が起こる。まず、タックマンプローブが鋳型DNAの特異的な配列にハイブリダイゼーションし（図2a）、同時に、鋳型DNAにハイブリダイゼーションしたPCRプライマーからの伸長反応が起こる（図2b）。この際、Taq DNAポリメラーゼは、5'ヌクレアーゼ活性を有しているため、PCRプライマーからの伸長反応がタックマ

ンプローブの5'末端まで達すると、タックマンプローブにおける蛍光レポーター色素Rを含むヌクレオチドを切断する(図2c)。このように、蛍光レポーター色素Rを含むヌクレオチドが切断されると、蛍光レポーター色素RがクエンチャーQの影響を受けなくなり、蛍光を呈することとなる。したがって、蛍光検出器により蛍光レポーター色素Rの蛍光を検出することによって、タックマンプローブと鋳型DNAとのハイブリダイズを確認することができる。

#### 【0024】

例えば、図3に示すように、SNP部位がAのアレル(アレル1とする)と、Gのアレル(アレル2とする)が存在すると仮定する。アレル1に特異的なタックマンプローブをFAMで標識するとともに、アレル2に特異的なタックマンプローブをVICで標識する(図3)。これら2種類のタックマンプローブをPCR試薬に添加し、タイピング対象のSNPを含む鋳型DNAについてタックマンPCRを行う。PCRを行うと、タイピング対象のSNP部位に相補的な塩基配列を持つタックマンプローブから、蛍光レポーター色素Rを含むヌクレオチドが遊離して蛍光を呈する。その後、蛍光検出器にてFAM及びVICの蛍光強度を測定する。

#### 【0025】

その結果、蛍光検出器にてFAMの強い蛍光を検出し、VICの蛍光をほとんど検出しない場合、鋳型DNAにおけるSNPがアレル1のホモ接合体であるとタイピングできる。また、蛍光検出器にてFAMとVICの両者の蛍光を検出する場合、鋳型DNAにおけるSNPがアレル1及びアレル2のヘテロ接合体であるとタイピングできる。さらに、蛍光検出器にてVICの強い蛍光を検出し、FAMの蛍光をほとんど検出しない場合、鋳型DNAにおけるSNPがアレル2のホモ接合体であるとタイピングできる。

#### 【0026】

一方、インバーダー法とは、タイピング対象のSNPを含むDNAと、タイピング対象のSNPのそれぞれのアレルに特異的な2種類のレポータープローブ及び1種類のインバーダープローブと、DNAの構造を認識して切断するという特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素とを用いる方法である(Livak, K. J. Biomol. Eng. 14, 143-149 (1999); Morris T. et al., J. Clin. Microbiol. 34, 2933 (1999)).

6); Lyamichev, V. et al., Science, 260, 778-783 (1993)等)。インバーダー法は、アレル特異的オリゴとタイピング対象のSNPを含むDNAとをハイブリダイゼーションすることによりSNP部位をタイピングすることができる。インバーダー法では、2種類の非標識オリゴと1種類の蛍光標識オリゴを用いる。2種類の非標識オリゴのうちのひとつは、アレルプローブと呼ばれるものである。

#### 【0027】

アレルプローブは、ゲノムDNA（鋳型DNA）とハイブリダイズして相補鎖を形成するハイブリダイズ領域と、ゲノムDNAの配列とは無関係な配列を有してゲノムDNAとハイブリダイズしない領域（フラップという）とから構成され、ハイブリダイズ領域のうち最も5'側をSNPに対応する塩基としている（図4a）。すなわち、アレルプローブは、ゲノムDNAにおけるSNP部位（図4a中「A」）を含み、当該SNP部位から5'側の領域と相補鎖を形成しうるハイブリダイズ領域と、SNPに対応する塩基（図4a中「T」）の5'側に付加されたフラップとを備えている。なお、フラップは、後述するフレットプローブの所定の領域と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドである。

#### 【0028】

もうひとつの非標識オリゴは、インバーダープローブと呼ばれている。このインバーダープローブは、SNP部位（図4b中「A」）からゲノムDNAの3'側方向に向かって相補的にハイブリダイズするように設計されている（図4b）。但し、SNP部位に対応する配列（図4b中、「N」）は任意の塩基でよい。従って、鋳型であるゲノムDNAと上記2つのプローブをハイブリダイゼーションさせると、SNP部位にインバーダープローブの1塩基（N）が割り込むように侵入する（図4c）。

#### 【0029】

蛍光標識オリゴは、ゲノムDNAと全く無関係な配列であり、SNPの種類によらず配列は共通である。この蛍光標識オリゴをフレット（FRET）プローブ（fluorescence resonance energy transfer probe）という（図5）。FRETプローブの5'末端の塩基（レポーター）には蛍光色素Rが標識されており、その上流にはクエンチャーQが結合している。従って、この状態ではクエンチャーが蛍光を吸収するため、蛍光検出器では蛍光を検出できない。

## 【0030】

また、FRETプローブの5'末端（レポーター塩基）から一定領域（領域1とする）は、その領域1よりも3'側の領域と向き合って相補的な配列となるように設計されている（これを領域2という）。従って、領域1は領域2と自分自身で相補鎖を形成する（図5）。また、この相補鎖形成領域よりもさらに3'方向の領域、すなわち、領域2の3'末端側は、アレルプローブにおけるフラップとハイブリダイズして相補鎖を形成できるように設計されている（図5）。

## 【0031】

インベーター法では、DNAの特殊な構造を認識して切断する特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素（5'ヌクレオチダーゼ）の1つであるクリベース（cleavase）を用いる。クリベースは、ゲノムDNA、アレルプローブ及びインベータープローブがSNP位置で3重になった時に、アレルプローブのSNP位置の3'側を切断することができる。従って、図4cのように3つの塩基が並び、5'末端がフラップ状になっている部分を認識して、そのフラップ部分を切断する。すなわち、このSNP部位の構造がクリベースにより認識され（図6a）、SNP部位に対応する塩基でアレルプローブが切断されフラップ部分が遊離する（図6b）。

## 【0032】

次に、アレルプローブから遊離したフラップ部分は、FRETプローブと相補的な配列をもつため相補結合する（図6c）。このとき、フラップのSNP部位がFRET自身の相補結合部位に割り込んで侵入する。クリベースは再びこの構造を認識して蛍光色素を有するレポーター塩基を切断する。切断された蛍光色素は、クエンチャーの影響を受けなくなり、蛍光を呈する（図6d）。なお、アレルプローブにおけるSNPに対応する塩基がSNP部位とマッチしない場合は、図7に示すように、クリベースが認識する特異的なDNA構造をとらないため、アレルプローブは切断されず、フラップが遊離しない。従って、この場合には、レポーター塩基に結合した蛍光色素は蛍光を呈しないこととなる。

## 【0033】

具体的に、例えば、あるSNP部位がT又はCを取りうる場合、インベータープローブ、T用のアレルプローブ、及びSNPに対応するレポーター塩基にFAMを結合さ

せたフレットプローブ、並びにこれとは別にインバーダープローブ、C用のアレ  
ルプローブ、及びSNPに対応するレポーターにVICを結合させたフレットプローブ  
とを準備し、全て混合してインバーダー法を行う。そして、蛍光検出器によって  
FAM及びVICの蛍光強度を検出することによって、SNP部位のタイピングを行う。  
すなわち、検出の結果、強いFAMの蛍光を検出し、VICの蛍光を検出できない場合  
には、SNPがT/Tのホモ接合体であるとタイピングできる。また、検出の結果、F  
AM及びVIC両方の蛍光が検出できる場合には、SNPがT/Cのヘテロ接合体であると  
タイピングできる。さらに、検出の結果、強いVICの蛍光を検出し、FAMの蛍光を  
検出できない場合には、SNPがT/Tのホモ接合体であるとタイピングできる。

## 【0034】

ところで、タイピング工程においては、いわゆるSniPer法を用いてもよい。Sn  
iPer法とは、RCA(rolling circle amplification)法と呼ばれる手法を基本原理  
とするものであり、環状の一本鎖DNAを鋳型としてDNAポリメラーゼがその上を移  
動しながら相補鎖DNAを連続して合成していくものである。この方法によれば、D  
NA増幅が起こった場合に生じる発色反応の有無を測定することによってSNPをタ  
イピングすることができる (Lizardi, P. M. et al., Nature Genet., 19, 225-  
232 (1998); Piat, A. S. et al., Nature Biotech., 16, 359-363 (1998))

## 【0035】

## 3. 本方法の効果

本方法では、採取又は抽出したゲノムDNAを増幅工程で増幅し、増幅したDNA断  
片を用いることで、目的のSNPについてタイピングを行うことができる。したが  
って、本方法によれば、ゲノムDNAが少量であっても、数十万箇所のSNPをタイピ  
ングすることができる。具体的に、本方法によれば、10万箇所のSNPをタイピ  
ングする場合、1箇所のSNPについて約0.4ngのゲノムDNAを要すると換算できるため  
、約40 $\mu$ gのゲノムDNAを準備すればよい。約40 $\mu$ gのゲノムDNAは、ヒトから採  
取した末梢血液5mlから抽出することができる。

## 【0036】

これに対して、ゲノムDNA自体を用いてインバーダー法等のSNPタイピングを行

う場合には、1箇所のSNPについて数十ngのゲノムDNAを要するため、10万箇所のSNPをタイピングするのに数mgのゲノムDNAを準備しなければならない。数mgのゲノムDNAは、末梢血液を500ml以上採取しなければならず、現実的に準備することができない。

【0037】

#### 【実施例】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1 ゲノムDNAの調製

インフォームドコンセントを得た被験者から採取した抹消血液より、白血球を単離しゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAの抽出は、ゲノム解析ラボマニュアル（中村祐輔編 シュプリンガー・フェアラーク東京）の方法に従って以下の通り行った。血液10mlを50mlのファルコンチューブに移し、室温で3000rpm、5分間遠心を行った。ピペットにて上清（血清）を採取した後、RBC溶解バッファー（10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 144mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ）を30ml加えた。沈殿がほぐれるまで混和した後、室温で20分放置した。室温で3000rpm、5分間遠心を行った後、ピペットにて上清（血清）を捨て、白血球のペレットを得た。RBC溶解バッファーを30ml加え、同様の操作をさらに2回行った。白血球のペレットにProteinase Kバッファー（50mM Tris-HCl(pH7.4), 100mM NaCl, 1mM EDTA(pH8.0))を4ml、10% SDSを200  $\mu$ l、10mg/ml Proteinase Kを200  $\mu$ l加え、転倒混和した後、37°Cで一晩静置した。フェノールを4ml加え、ローテーター（Rotator T-50, Taitec）にて4時間ゆっくりと転倒混和した。室温で3000rpm、10分間遠心を行い、上層を新しいチューブに回収した。4mlのフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール（容積比25:24:1）を加え、同様に2時間転倒混和した後、遠心した。上層を新しいチューブに回収し、4mlのクロロホルム-イソアミルアルコール（容積比24:1）を加え、同様に30分転倒混和した後、遠心した。上層を新しいチューブに回収し、8M 酢酸アンモニウム400  $\mu$ l、イソプロパノール4mlを加え、転倒混和した。糸状の白色析出物（DNA）を2ml容のチューブに回収し、70%エタノールを1ml加え、転倒混和した。新しい2ml容のチューブにDNAを回収し風乾した後、TE溶液（10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM ED

TA(pH7.4))を500 $\mu$ l加え、溶解後、ゲノムDNAサンプルとした。

【0038】

## 実施例2 ゲノムDNAの増幅

実施例1で得たゲノムDNAのうち40ngを用いて50 $\mu$ l系にてPCRを行った。反応液には、各50pmolの200種類のプライマー(100対、配列番号1~200)、EX-TaqDNAポリメラーゼ(宝酒造株式会社製)10ユニット、TaqStart (CLONTECH Laboratories社製)0.55 $\mu$ gを混入している。このTaqStartは、EX-TaqDNAポリメラーゼに対する抗体であり、反応液に加えることによってホットスタートを行うことができる。

【0039】

また、PCRは、GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems社製)で行った。最初に94℃、2分でDNAを変性させた後、94℃、15秒の変性工程、60℃、45秒のアニーリング工程、72℃、3分の伸長工程から成るサイクルを35回繰り返し、さらに72℃、3分で伸長させた。

このPCRでは、表1に示すように、SNP番号(表1中「SNP ID」と記す)1~100を含む複数のDNA断片を同時に増幅することができる。

【0040】



【表1】

SNP ID	フォワードプライマー	リバースプライマー	SNP name
1	配列番号1	配列番号2	AC000353.27_20000214_5_24737
2	配列番号3	配列番号4	AC000388.1_19970529_9_37703
3	配列番号5	配列番号6	AC001643.1_19970529_3_6293
4	配列番号7	配列番号8	AC002237.1_19970606_1_1204
5	配列番号9	配列番号10	AC002319.1_19980203_3_29222
6	配列番号11	配列番号12	AC002364.1_19981204_2_117944
7	配列番号13	配列番号14	AC003005.1_19971022_1_2731
8	配列番号15	配列番号16	AC003005.1_19971022_3_5667
9	配列番号17	配列番号18	AC003689.1_19981121_2_45471
10	配列番号19	配列番号20	AF066064.1_19980603_1_563
11	配列番号21	配列番号22	AF077374.1_19990202_1_1708
12	配列番号23	配列番号24	AF157101.1_19990624_1_618
13	配列番号25	配列番号26	AF196968.1_19991109_1_6368
14	配列番号27	配列番号28	AJ009610.1_19990104_4_26810
15	配列番号29	配列番号30	AJ011772.1_19981005_2_903
16	配列番号31	配列番号32	AJ011931.1_19981110_5_23638
17	配列番号33	配列番号34	AJ229043.1_19990122_1_3475
18	配列番号35	配列番号36	AL008633.1_19971029_1_33923
19	配列番号37	配列番号38	AL008634.1_19981109_13_92880
20	配列番号39	配列番号40	AL008634.1_19981109_13_93343
21	配列番号41	配列番号42	AL008634.1_19981109_14_95554
22	配列番号43	配列番号44	AL008638.1_19981123_4_52385
23	配列番号45	配列番号46	AL008730.1_19980204_2_66080
24	配列番号47	配列番号48	AL008733.10_19991225_1_5608
25	配列番号49	配列番号50	AL008734.10_19990610_1_7867
26	配列番号51	配列番号52	AL021917.1_19980721_19_77217
27	配列番号53	配列番号54	AL021937.1_19990303_93_124364
28	配列番号55	配列番号56	AL022721.1_19990324_13_73842
29	配列番号57	配列番号58	AL023279.1_19990305_3_69539
30	配列番号59	配列番号60	AL049557.19_73359
31	配列番号61	配列番号62	AL049569.13_164971
32	配列番号63	配列番号64	AL049569.13_61322
33	配列番号65	配列番号66	AL049569.13_61680
34	配列番号67	配列番号68	AL049569.13_61971
35	配列番号69	配列番号70	AL049569.13_62026
36	配列番号71	配列番号72	AL049569.13_87106
37	配列番号73	配列番号74	AL049569.13_87279
38	配列番号75	配列番号76	AL049569.13_88461
39	配列番号77	配列番号78	AL049569.13_88502
40	配列番号79	配列番号80	AL049575.7_10509
41	配列番号81	配列番号82	AL049611.24_75054
42	配列番号83	配列番号84	AL049611.24_75895
43	配列番号85	配列番号86	AL049612.11_45784
44	配列番号87	配列番号88	AL049649.4_93434
45	配列番号89	配列番号90	AL049649.4_93918
46	配列番号91	配列番号92	AL049650.8_62150
47	配列番号93	配列番号94	AL049691.17_64637
48	配列番号95	配列番号96	AL049694.9_4336
49	配列番号97	配列番号98	AL049698.3_3216
50	配列番号99	配列番号100	AL049698.3_3822

51	配列番号101	配列番号102	AL049758.11_67143
52	配列番号103	配列番号104	AL049758.11_79044
53	配列番号105	配列番号106	AL049759.10_111608
54	配列番号107	配列番号108	AL049795.20_113584
55	配列番号109	配列番号110	AL049829.2_138544
56	配列番号111	配列番号112	AL049829.2_161140
57	配列番号113	配列番号114	AL049843.18_49141
58	配列番号115	配列番号116	AL096766.12_13162
59	配列番号117	配列番号118	AP000065.1_58129
60	配列番号119	配列番号120	AP000168.1_56285
61	配列番号121	配列番号122	AP000171.1_87106
62	配列番号123	配列番号124	AP000347.1_81990
63	配列番号125	配列番号126	AP000349.1_19017
64	配列番号127	配列番号128	AP000350.1_10554
65	配列番号129	配列番号130	AP000350.1_10756
66	配列番号131	配列番号132	AP000350.1_11294
67	配列番号133	配列番号134	AP000350.1_31581
68	配列番号135	配列番号136	AP000352.1_63635
69	配列番号137	配列番号138	AP000353.1_86203
70	配列番号139	配列番号140	AP000355.1_132012
71	配列番号141	配列番号142	AP000493.1_129114
72	配列番号143	配列番号144	AP000495.1_60416
73	配列番号145	配列番号146	AP000500.1_113211
74	配列番号147	配列番号148	AP000500.1_113401
75	配列番号149	配列番号150	AP000500.1_194483
76	配列番号151	配列番号152	AP000500.1_25277
77	配列番号153	配列番号154	AP000501.1_137357
78	配列番号155	配列番号156	AP000501.1_99530
79	配列番号157	配列番号158	AP001041.1_6501
80	配列番号159	配列番号160	AP001041.1_6582
81	配列番号161	配列番号162	AP001054.1_35804
82	配列番号163	配列番号164	AP001054.1_36083
83	配列番号165	配列番号166	AP001054.1_36142
84	配列番号167	配列番号168	AP001101.1_12400
85	配列番号169	配列番号170	D42052.1_7718
86	配列番号171	配列番号172	D50561.1_1218
87	配列番号173	配列番号174	D50561.1_564
88	配列番号175	配列番号176	NT_002717.1_29435
89	配列番号177	配列番号178	U07563.1_68521
90	配列番号179	配列番号180	X56832.1_2826
91	配列番号181	配列番号182	X69299.1_1633
92	配列番号183	配列番号184	X74107.1_29168
93	配列番号185	配列番号186	X74107.1_29545
94	配列番号187	配列番号188	X78901.1_1934
95	配列番号189	配列番号190	X87344.1_115764
96	配列番号191	配列番号192	X91863.1_2477
97	配列番号193	配列番号194	Y08378.1_1560
98	配列番号195	配列番号196	Y12852.1_4439
99	配列番号197	配列番号198	Y16792.1_4230
100	配列番号199	配列番号200	Z54246.1_8005

【0041】

## 実施例3 インバーダー法によるタイピング

実施例2に記載したPCR後の試料を0.2 $\mu$ lずつ100個に分注し、インバーダーア

ッセイキット (Third Wave Technology社製) を用いて100種類のSNPタイピングを行った。すなわち、キットに含まれる、シグナルバッファ0.5 $\mu$ l、FRETプローブ0.5 $\mu$ l、構造特異的DNA分解酵素0.5 $\mu$ l、アレル特異的プローブ1 $\mu$ lに試料0.5 $\mu$ lを加え、反応体積を10 $\mu$ lに調製した。FRETプローブは異なる蛍光色素 (FAM、VIC) で標識され、異なるフラップ相補的配列を有する2種類を用いる。一对のプローブは2種類のFRETプローブに対応するフラップ部分を有する。この反応液をABI7700 (Applied Biosystems) を用いて、95°C、5分、続いて63°C、15分インキュベートし、この間に発した蛍光を同機を用いて検出した。

## 【0042】

SNP番号1のプローブにより異なる3サンプルをタイピングした結果を図8a,b,cにそれぞれ示す。図8において、実線はFAMの蛍光、波線はVICの蛍光を示す。図8aに示すように、このサンプルでは、VICによる蛍光のみが上昇している。このことは、このサンプル中におけるSNP番号1の塩基が、両アレルともVICで標識されたFRETプローブに相補的なフラップを持つ特異的プローブに対応すること、すなわち、このサンプルがホモ接合体であることを示している。図8bのサンプルの場合、一方のアレルがFAMで標識されたFRETプローブに相補的なフラップを持つ特異的プローブに対応し、他方のアレルがVICで標識されたFRETプローブに相補的なフラップを持つ特異的プローブに対応することを示している。すなわち、本サンプルはヘテロ接合体であることを示している。なお、図8cに示すサンプルは、FAMで標識されたFRETプローブに相補的なフラップを持つ特異的プローブに対応するホモ接合体であることが示された。

## 【0043】

また、SNP番号1~100について、98%のSNPについて蛍光が検出された。この結果は、本法を用いることにより1 SNPにつき0.4ngという極少量のゲノムDNAでタイピングが可能であったことを示している。

一方、0.4ngのゲノムDNAを用いて直接インベーター法を行った場合には、図9に示すように、蛍光を検出することができず、タイピングが不可能であった。これは、アッセイに用いたDNA量 (0.4ng) が少なかったため、検出に十分な蛍光が得られなかったものと考えられる。

【0044】

【発明の効果】

以上、詳細に説明したように、本発明に係る一塩基多型タイピング方法では、極く少量のゲノムDNAを用いて数十万箇所に及ぶSNP部位についてタイピングを行うことができる。したがって、本発明に係る一塩基多型タイピング方法によれば、極く少量のゲノムDNAを用いて、短時間、且つ低コストで数十万箇所に及ぶSNP部位についてタイピングを行うことができる。

【0045】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A method for SNP typing

<130> RJH12-116S

<140>

<141>

<160> 200

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 1

20

ccagcaggac ttggtgacag

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 2

21

gcaagaagca gccagatcaa g

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

20

cagccacca ctcagtcttg

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

aggtcctggc tctgcgtaac

20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gcttgagact caccctctga tg

22

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

gtcccgactt gaaggtccac

20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

tctgccaagc agaaacctag ag

22

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

ggcaccttga gaggaatgc

19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

ctttccgaca acgagagcg

19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10

cacctggact ctgcatacctg

20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11

aggccgtgag ggaatgatg

19



<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12

20

gggtgtctag catggtgctg

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 13

21

ttcagcatag ctccagaagg c

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 14

tttggaccct tgcctaaca ac

22

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 15

tggctcacta aatgcactac cac

23

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

acctggaggt gaagcgagac

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

accacaggct ccaggaagtg

20

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 18

tgcgtttgca ctggtaggc

19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 19

20

cactcccacc accatcactg

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 20

20

gctcacggaa ctggaagacg

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21

22

caggtgacat cactgtcaga gc

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 22

20

acctgctgct gttgaagctg

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23

23

cgttggaagc ctgtactcct tag

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 24

20

aggagagctc acccgaagtg

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

20

ggcacctctc caggattgtg

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26

20

gaagccaggg caagtcattg

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 27

20

cccaaggccc actgtgttac

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 28

20

cctggtgccca agtggtcaag

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 29

20

gagcattgcc ctcctcactg

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 30

22

gtgccacaat tgatatgacc ag

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 31

20

gcctctacct ttaccgtccg

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 32

20

gccacctccc tgtcttcac



<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 33

21

cagcttcagg ccaaagtat g .

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 34

20

tcacacctcc tcctccattg

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 35

20

tccaccctga tcaagtccag

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 36

19

gcatgggtgc actgttgac

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 37

22

aaattaaggc acaggcagtg ag

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 38

gtcctctgct ttgctcaggc

20

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 39

aaattaaggc acaggcagtg ag

22

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 40

gtcctctgct ttgctcaggc

20

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 41

24

tctatgtggg taggatctcc agac

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 42

21

tcgaaacaga agatgtggct g

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 43

20

cagcagcaac aacaaccgtc

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 44

24

cccaagtgtg gtaggtttac aatg

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 45

20

gaaatgcctc cctggaacag

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 46

19

ctctgccaag cccatcttg

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 47

20

tccctgagcc caggtaagtc

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 48

21

tggtccctga tcctcatcca g

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 49

24

catcctcgtc actgactaat agcg

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 50

20

tcaacagcga actccacctg

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 51

gccagggact gaagctgaac

20

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 52

aaagcatcag tgggcagaat c

21

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 53

tggtgagtgg tgaggtatta gcag

24

<210> 54



<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 54

22

cactacatgg cacctcagga ag

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 55

21

agggattcag tcagttccga g

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 56

24

cgttacttcc aaatgtcagg agtg

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 57

24

cactttgagc actctcagga gaac

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 58

20

gctttgagca aggcttccag

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 59

20

gagaacgggc tgaggacaag

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 60

20

tgccagagaa aggtgactg

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 61

24

ccctgagtct agctcaaate tctc

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 62

21

cctgctcctt gagcttgta c

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 63

20

ctgagggtcc cttaccaag

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 64

22

gcaacagcct gaatgtacac ag

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 65

20

ctgagggtcc cttaccaag

<210> 66

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 66

22

gcaacagcct gaatgtacac ag

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 67

20

ctgagggtcc cttcaccaag

<210> 68

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 68

22

gcaacagcct gaatgtacac ag

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 69

20

ctgagggtcc cttcaccaag

<210> 70

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 70

gcaacagcct gaatgtacac ag

22

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 71

ccactgtcct ggctcagatg

20

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 72

21

gaggatgtca cggttccagt c

<210> 73

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 73

24

gtgaccttcc tctgtcctat tacg

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 74

20

tttcagcagg gacagagtcg

<210> 75

<211> 24



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 75

gtgaccttcc tctgtcctat tacg

24

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 76

tttcagcagg gacagagtcg

20

<210> 77

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 77

gtgaccttcc tctgtcctat tacg

24

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 78

tttcagcagg gacagagtcg

20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 79

atccactggc cattctgctg

20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 80

gctcaaggca gactggtgtc

20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 81

aggcagacaa atcgccactc

20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 82

tgcattgggct tcagtagagc

20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 83

aggcagacaa atgccactc

20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 84

tgcatgggct tcagtagagc

20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 85

tgtgggctgc tctgaggtag

20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 86

cccaccctcc ttggtaatg

20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 87

gggaagaccc agccataatc

20

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 88

gagttggtgg gcactaaggt g

21

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 89

gggaagaccc agccataatc

20

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 90

gagttggtgg gcactaaggt g

21

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 91

ctgggcctgt gtcttcactg

20

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 92

ggcaaaggtc ttggtgtcaa c

21

<210> 93

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 93

gcagccctct gactatatga gttg

24

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 94

agaacgcagc aaggaagcac

20

<210> 95

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 95

gattagcgtt tctttcagcc atc

23

<210> 96

<211> 22

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 96

tctgaattcc cattcttcat gc

22

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 97

ggccaaaggt tccaggagag

20

<210> 98

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 98

cgatgcagag actgtccaga g

21

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 99

ggccaaaggt tccaggagag

20

<210> 100

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 100

cgatgcagag actgtccaga g

21

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 101

cctcctcagt ttctccagcg

20

<210> 102

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 102

tgggcatctg aatggaagc

19

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 103

accaatccaa gggctaggtg

20

<210> 104

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 104

caggtccagc agtgatccat ac

22

<210> 105

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 105

gttacaaacc tgacttgtgg ctc

23

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 106

ggctatgagt tcccgtcag

20

<210> 107

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 107

gccaaacaat ccctcatgat ac

22

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 108

atgcttcctc taccatggcg

20

<210> 109

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 109

tcccaactca tttagcatc tc

22

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 110

tgtctgcctc cctgactctg

20

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 111

ttaactggcc ctgtctggtg

20

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 112

gtgcacacag aggtgtagcg

20

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 113

gggcttcttc tgcattgtgtg

20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 114

tgcttccac tgttctcagc

20

<210> 115

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 115

aaacctcact gtctgcttcc tg

22

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 116

caggtgagat cggcacactc

20

<210> 117

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 117

ccacctgtaa gaacagaagt ggc

23

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 118

acccaagttt gggactctgc

20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 119

tttggccttg tttgcctctg

20

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 120

aaggccacag ttgagaacg

20

<210> 121

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 121

gagtgtggtc cataaacttg gc

22

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 122

accacgtctc tagccagtcg

20

<210> 123

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 123

gctgtgtgac gttaggccag

20

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 124

agatactggg ttccatccgc

20

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 125

gttctcggag gtggctcttg

20

<210> 126

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 126

ccacatcact ctctcctgca tc

22

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 127

gcttattcct gcaaggcgtc

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 128

aatggaagcc aaaggcacag

20

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 129

gcttattcct gcaaggcgtc

20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 130

aatggaagcc aaaggcacag

20

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 131

gcttattcct gcaaggcgtc

20

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 132

aatggaagcc aaaggcacag

20

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 133

aaccctgagc ctgtcacctg

20

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 134

tgagccctga atgcgagtag

20

<210> 135

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 135

tgtgaccttc ctggctcttc

20

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 136

agcctcactg acatgccttg

20

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 137

caactgtgag tgaccgtgga g

21

<210> 138

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 138

agtgaggtat tggaatctga ggc

23

<210> 139

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 139

caatattagc tccaccgagg c

21

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 140

cctcgccaac taaatgcaga c

21

<210> 141

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 141

cataagccga gtggtacaga gc

22

<210> 142

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 142

tccaaaggcc atagtttacc aag

23

<210> 143

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 143

tggcttgagg ttctggcttc

20

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 144

tgtgacgggt aaggcagatg

20

<210> 145

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 145

cctatgctca gccaaggtca g

21

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 146

agaaccacct gggctgctac

20

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 147

cctatgctca gccaaaggtca g

21

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 148

agaaccacct gggctgctac

20

<210> 149

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 149

ctgtgatggg ctgcagaatg

20

<210> 150

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 150

ggagagcctc cagttcaagc

20

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 151

cacccagtgc agccttatag c

21

<210> 152

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 152

acctccctct ctgccttctg

20

<210> 153

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 153

accacggagt ctggcatcac

20

<210> 154

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 154

cggtcagaac aaagagagtg gaac

24

<210> 155

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 155

tttgtccttg ggcttggtag

20

<210> 156

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 156

cagggagagg tatacgatgg tg

22

<210> 157

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 157

cccatcccgt taaagcactt ag

22

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 158

aggatgggct tcccactcag

20

<210> 159

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 159

cccatcccgt taaagcactt ag

22

<210> 160

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 160

aggatgggct tcccactcag

20

<210> 161

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 161

gtgtgctttg tttggtttgc atag

24

<210> 162

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 162

ctgggaatgt gccagcaag

19

<210> 163

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 163

gtgtgctttg tttggtttgc atag

24

<210> 164

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 164

ctgggaatgt gccagcaag

19

<210> 165

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 165

gtgtgctttg tttggtttgc atag

24

<210> 166

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 166

ctgggaatgt gccagcaag

19

<210> 167

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 167

ccgtgggaac atcctctgtg

20

<210> 168

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 168

gggtttgcag aatcagcctc

20

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 169

ggcacacttg agcacttgat g

21

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 170

ggaggacaca cagaggaatg c

21

<210> 171

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 171

caaacaggtc acatttgctg aag

23

<210> 172

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 172

tggcccacac agactaataa gc

22

<210> 173

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 173

caaacaggtc acatttgctg aag

23

<210> 174

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 174

tggcccacac agactaataa gc

22

<210> 175

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 175

ggaggcctga cagccatatc

20

<210> 176

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 176

gccatatgtg gaacaagcag c

21

<210> 177

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 177

ttcttttctgc catcaagttg c

21

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 178

gctttgccag ggcctagtg

20

<210> 179

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 179

tgtgatcttc caattcctcc tg

22

<210> 180

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer



<400> 180

tatggcaggg aaggaagcac

20

<210> 181

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 181

tggtgaagct gctggatgac

20

<210> 182

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 182

gacacccacc aaagcatgta taac

24

<210> 183

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 183

tgcaccagac agggtagctg

20

<210> 184

<211> 346

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 184

ccatccagcc aagtccttgt agtgcaccag acagggtagc tgccatccag ccaagtcctt 60  
 gtagccagac ggcttagagc actgcgagag catccaccag agtgggacgg atgaagatga 120  
 acgcatccca gcagccctct tagcttgcct tgaacttgct ctgccacacc tgccctttat 180  
 tggctctctc agcaggtaca ggcacgcctt catctctgca agtccctca tgccttggtg 240  
 cattgagctg cgaagagagc cagaggatca caggctgtag gcagatgcca tccagactgg 300  
 gtcagtgtc catgtgggaa tcggtgtcaa ggcacatcac atggtc 346

<210> 185

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 185

tgcaccagac agggtagctg

20

<210> 186

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 186

ccatccagcc aagtccttgt ag

22

<210> 187

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 187

ccagacggct tagagcactg

20

<210> 188

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 188

cgagagcatc caccagagtg

20

<210> 189

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 189

ggacggatga agatgaacgc

20

<210> 190

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 190

atcccagcag ccctcttagc

20

<210> 191

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 191

ttgccttgaa cttgctctgc

20

<210> 192

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 192

cacacctgcc ctttattggt c

21

<210> 193

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 193

tctccagcag gtacaggcac

20

<210> 194

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 194

gccttcacatct ctgcaagctc

20

<210> 195

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 195

cctcatgtcc tgggtcattg

20

<210> 196

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 196

agctgcgaag agagccagag

20

<210> 197

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 197

gatcacaggt cgtaggcaga tg

22

<210> 198

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 198

ccatccagac tgggtcagtg

20

<210> 199

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 199

ctccatgtgg gaatcggtg

19

<210> 200

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 200

tcaaggcaca tcacatggtc

20

【 0 0 4 6 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1~200は合成プライマーである。

【図面の簡単な説明】



【図 1】

タックマンプローブを模式的に示す図である。

【図 2】

タックマンPCR法の各工程を概略的に示す図である。

【図 3】

蛍光標識を付したタックマンプローブを模式的に示す図である。

【図 4】

インバーダー法を概略的に示す図である。

【図 5】

フレットプローブを模式的に示す図である。

【図 6】

インバーダー法を概略的に示す図である。

【図 7】

アレルとマッチしないプローブを模式的に示す図である。

【図 8】

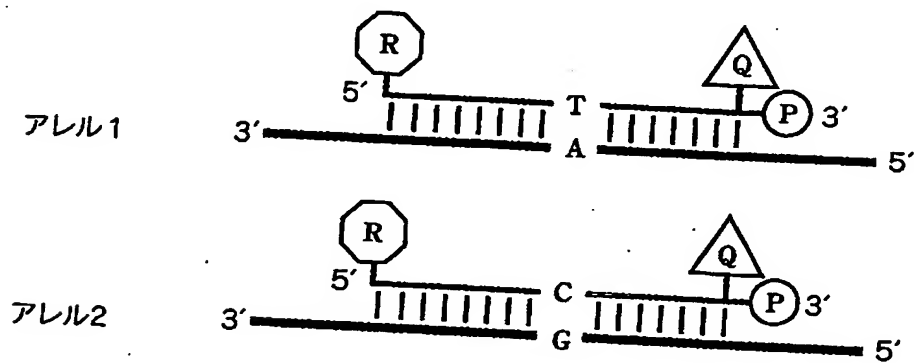
SNP番号 1 をタイピングした結果を示す特性図である。

【図 9】

ゲノムDNAを直接インバーダー法に用いてタイピングした結果を示す特性図である。

【書類名】 図面

【図1】

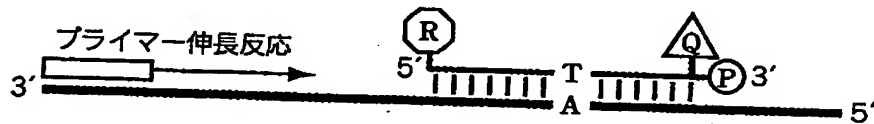


【図2】

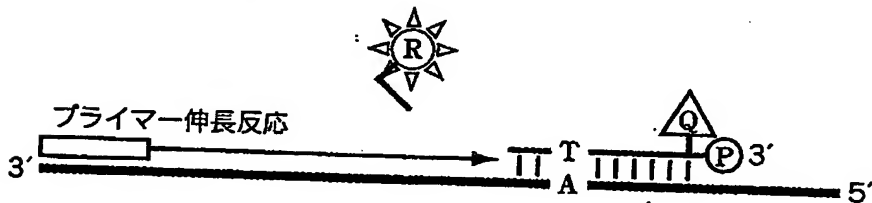
a. ハイブリダイゼーション



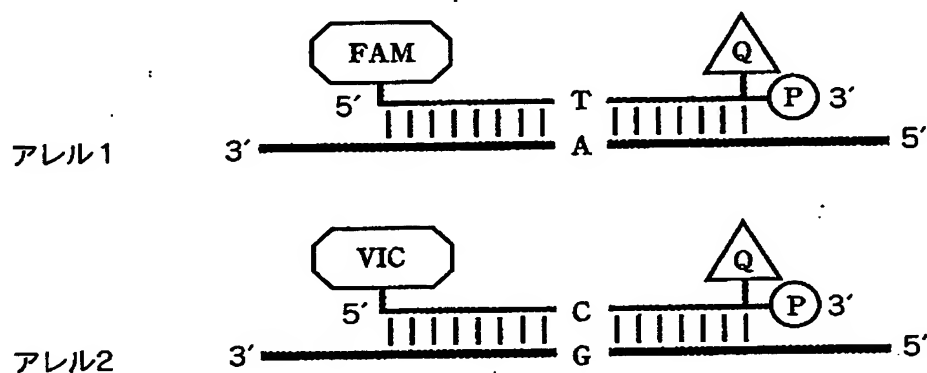
b. PCR反応



c. 5'ヌクレアーゼ活性

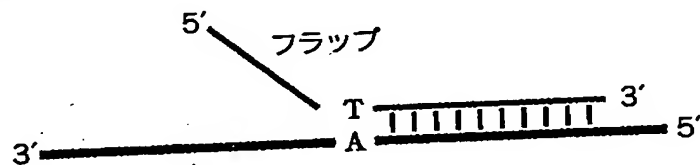


【図 3】



【図 4】

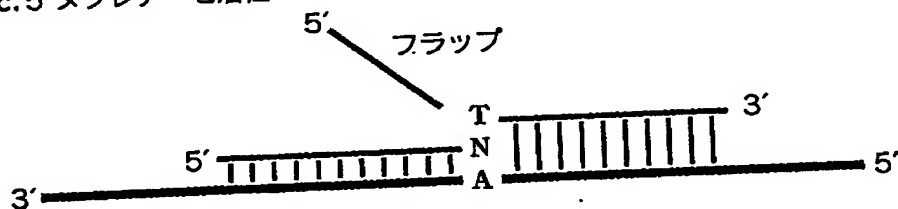
a. アレルプローブ



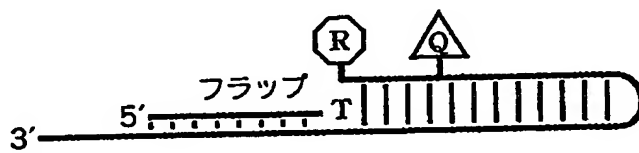
b. インベータープローブ



c. 5'ヌクレアーゼ活性

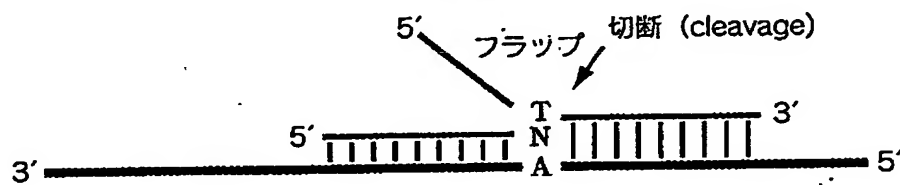


【図 5】

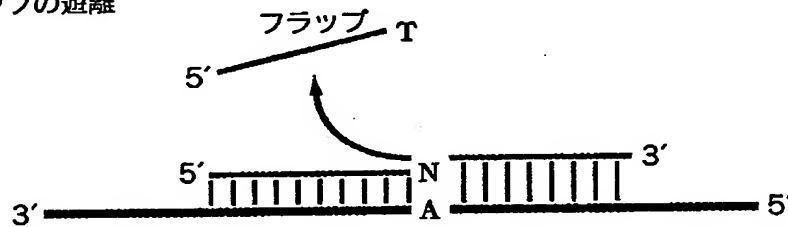


【図 6】

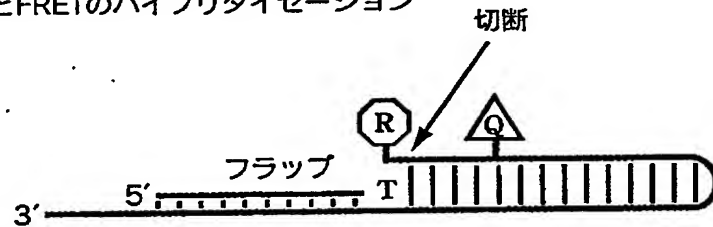
a. cleavageによるアレルプローブの切断



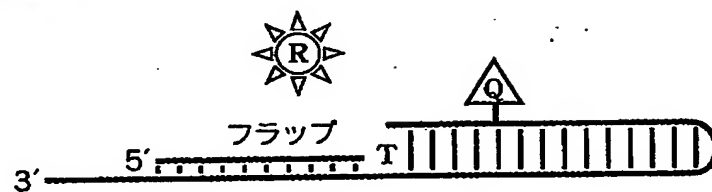
b. フラップの遊離



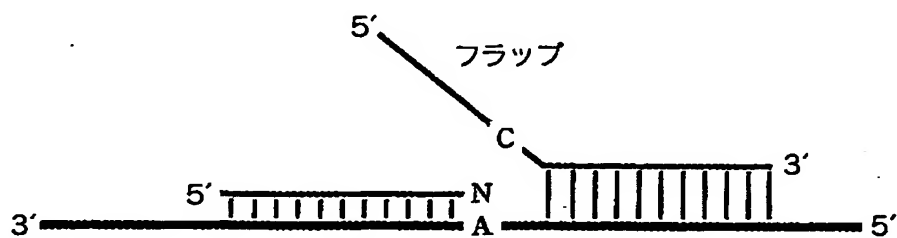
c. フラップとFRETのハイブリダイゼーション



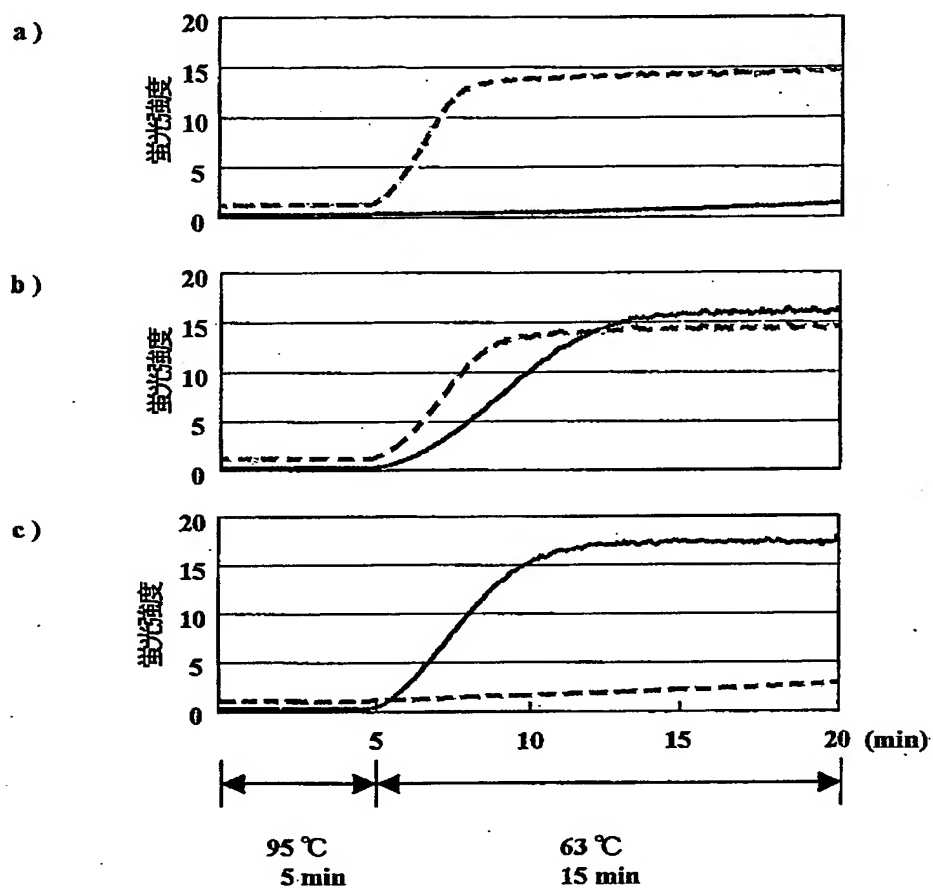
d. 蛍光色素の遊離



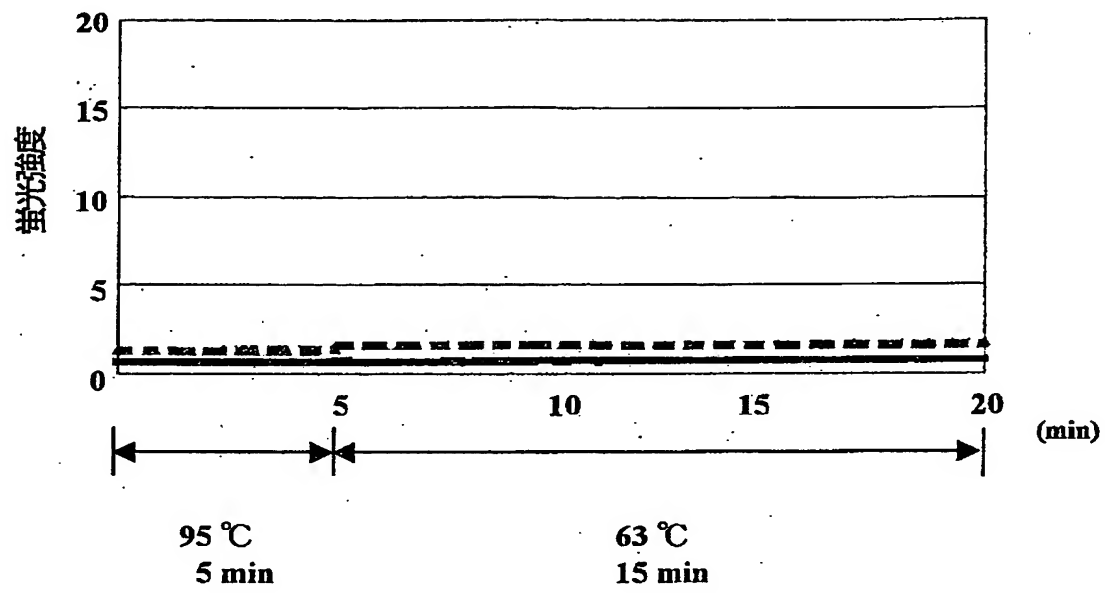
【図 7】



【図 8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 比較的に少量のゲノムDNAを用いて数十万箇所にあつたSNP部位についてタイピングを行う。

【解決手段】 少なくとも一つ以上の一塩基多型部位を含む複数の塩基配列を、ゲノムDNA及び複数対のプライマーを用いて同時に増幅する増幅工程と、上記増幅工程で増幅した複数の塩基配列を用いて、当該塩基配列に含まれる一塩基多型部位の塩基を判別するタイピング工程とを含むものである。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所